

INFECCIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

Las infecciones del tracto respiratorio inferior son una causa importante de morbilidad y mortalidad. Se pueden obtener una gran diversidad de muestras, cada una de las cuales, estarán indicadas en procesos infecciosos y circunstancias determinadas. Por otra parte, el diagnóstico microbiológico se complica por la dificultad de obtener una muestra no contaminada con la flora del tracto respiratorio superior. Es por tanto de la máxima importancia que el laboratorio se asegure de que la muestra que se está procesando sea adecuada tanto para el proceso que se quiere diagnosticar como por su calidad (no contaminada con flora del tracto superior).

Todas las muestras del tracto respiratorio deberán procesarse en cabinas de seguridad biológica.

TIPOS DE MUESTRAS

A. MUESTRAS OBTENIDAS POR MÉTODOS NO INVASIVOS

Espustos, aspirados traqueales y aspirados bronquiales

1. Procedimiento:

Se investigarán rutinariamente, las bacterias productoras habituales de neumonías: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, Enterobacterias, bacilos Gram negativos no fermentadores, *Staphylococcus aureus*.

Se valorará la presencia en cultivo puro o predominante.
Asimismo, se valorará la presencia de hongos filamentosos.

Se estudiará especialmente, cuando se solicite o cuando se sospeche:

- Micobacterias (por sus técnicas diferentes, no se recogen en este protocolo).
- *Nocardia* ssp.
- *Legionella pneumophila*.

2. Toma de muestra:

a. Espustos

La toma correcta del esputo es fundamental. Es aconsejable que el paciente se enjuague la boca previamente con solución salina o agua. El esputo procederá de una expectoración profunda preferentemente matinal por lo cual hay que instruir al paciente para que no expectore saliva o descarga postnasal dentro del contenedor. Si no se produce expectoración espontánea puede inducirse el esputo con nebulizaciones de suero salino fisiológico estéril.

Se aconseja que las muestras de esputo sean siempre examinadas por personal capacitado antes de enviar al laboratorio, para comprobar que no es sólo saliva.

b. Aspirado traqueal

Se realiza a través del tubo endotraqueal o traqueotomía.
Es una muestra, en general de poca utilidad diagnóstica.

c. Aspirado bronquial

Se recogen secreciones bronquiales, pudiendo introducirse de 3 a 5 ml. de solución salina estéril.

3. Transporte y conservación de las muestras

Recoger la muestra en contenedores estériles con cierre de rosca hermético, de boca ancha.

Si el envío se demora más de una hora conservar en frigorífico (2-8°C)

4. Criterios de rechazo

- Muestras constituidas exclusivamente por saliva.
- Identificación incorrecta de la muestra.
- Conservación inadecuada de la muestra.
- Contenedores mal cerrados o rotos con muestras derramadas.

5. Observación macroscópica:

Se anotará si el esputo es purulento, hemoptoico, mucoide o contiene saliva.

6. Procesamiento microbiológico:

Se debe procesar la parte más purulenta o hemoptoica, o bien homogeneizar la muestra.

7. Evaluación de la calidad de la muestra:

Examen microscópico. Tinción de Gram:

a) Para evaluar la calidad de las secreciones respiratorias indicada por la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y la presencia de contaminación orofaríngea indicada por las células epiteliales (CEs). Se observan de 10 a 20 campos con el objetivo 10X y se promedia el número de células epiteliales y PMNs por campo.

Son muestras aceptables para estudio microbiológico:

1. Muestras con menos de 10 CEs y más de 25 PMNs por campo de 10X.
2. Muestras con una relación de PMNs y CEs = 2:1.
3. En pacientes leucopénicos, muestras sin leucocitos y sin CEs pero con células ciliadas respiratorias derivadas de tracto respiratorio inferior.

b) Si la muestra es aceptable según los criterios anteriores, examinar con aceite de inmersión (objetivo de 100X) para identificar el microorganismo patógeno más probable indicado por el microorganismo predominante. Asimismo, se anotará la presencia de otros morfotipos bacterianos de interés (concentrar el examen en las zonas con leucocitos, evitando las zonas con contaminación orofaríngea).

Si la muestra no es de calidad aceptable según los criterios anteriores (abundantes células epiteliales y ningún microorganismo predominante), el laboratorio debe adoptar, en general, el criterio de no cultivar e informar de la siguiente manera: "Muestra con abundantes células epiteliales indicativas de contaminación con flora orofaríngea. Enviar nueva muestra."

Auramina: es recomendable realizar auramina rutinariamente a todos los esputos.

8. Cultivo:

Puede realizarse cualitativo (observar organismo predominante) o cuantitativo, sembrando con asa calibrada el esputo homogeneizado (1 ó 10 ml.) (significativo igual o mayor de 10⁶ ufc/ml).

Agar Sangre CO₂
Agar chocolate CO₂
MacConkey

9. Examen de las placas

Se examinan todas las placas a las 24 y 48 horas, excepto el MacConkey, que se descartará si es negativo a las 24 horas.

Si en agar sangre y agar chocolate sólo se observa flora orofaríngea descartar los cultivos.

- Agar sangre: Valorar microorganismo predominante o con recuento significativo, con especial interés en *S.pneumoniae* y en su caso el *S. aureus*.

- Agar Chocolate: Valorar microorganismo predominante o con recuento significativo con especial interés en *H.influenzae* y *M. catarrhalis*.

- Agar MacConkey: Valorar bacilos Gram negativos abundantes y predominantes como enterobacterias o bacilos Gram negativos no fermentadores.

10. Informes:

Si se aísla algún patógeno en cultivo predominante o recuento significativo: “Crecimiento predominante de” o “Número de UFC/ml. de.....”.

Si no se aísla ningún patógeno en cultivo predominante y sí flora orofaríngea: “Desarrollo de flora habitual”.

Si el cultivo es negativo después de 48 horas: “Cultivo negativo”.

SOLICITUDES ESPECIALES

- *Legionella pneumophila*

En caso de sospecha, recomendamos la detección de antígenos en orina.

Otras técnicas a realizar:

- Inmunofluorescencia directa.
- El cultivo en medios enriquecidos y selectivos de Legionella. Incubar las placas en CO₂ una semana.

- *Nocardia* spp

Tinción de Gram: bacilos Gram positivos ramificados y filamentosos.

Tinción de Ziehl ó Kynoun: bacilos débilmente ácido- alcohol resistentes.

Sembrar en agar sangre y BHI agar. Incubar las placas una semana en atmósfera de CO₂.

En incubaciones prolongadas se recomienda el sellado de las placas.

- Fibrosis Quística:

Para el estudio de las secreciones respiratorias de la fibrosis quística se recomienda contactar con el Servicio de Microbiología o que se indique claramente en el volante de petición.

B. MUESTRAS OBTENIDAS POR MÉTODOS INVASIVOS

a. Lavados broncoalveolares

1. Procedimiento:

Cultivo cuantitativo en aerobiosis para aislamiento de bacterias productoras de neumonía. Se consideran recuentos significativos los recuentos iguales o superiores a 10⁴ UFC/ml.

Cultivo no cuantitativo para investigación de *Legionella* spp y hongos.

En pacientes con factores de riesgo, se realizarán tinciones para investigación de *P. carinii*.

Cultivo de Micobacterias y virus (ver protocolo correspondiente).

2. Toma de la muestra:

Se realiza mediante fibrobroncoscopio.

3. Transporte y conservación:

n contenedores estériles. Enviar la muestra de inmediato al laboratorio, los anestésicos locales tienen acción antimicrobiana y antimicobacteriana. Cuando no sea posible el envío inmediato, conservar entre 2-8°C.

4. Criterios de rechazo:

- Muestras mal identificadas (contactar con el clínico peticionario).
- Muestras derramadas por remitirse en contenedores mal cerrados o rotos.

5. Procesamiento de la muestra:

Se debe homogeneizar la muestra en agitador y si fuera necesario con perlas de vidrio estériles.

6. Examen directo:

Según la sospecha diagnóstica, se realizarán extensiones del sedimento obtenido tras centrifugar para las siguientes determinaciones:

- Tinción de Gram: Valoración de la muestra.
- Tinción de Giemsa: *P. carinii*, hongos, otros...
- Tinción para hongos (blanco de calcoflúor, potasa u otras)
- Inmunofluorescencia de *P. carinii*.
- Inmunofluorescencia de *Legionella pneumophila*.

7. Cultivo:

Sembrar cuantitativamente para que permita el recuento de como mínimo 104 ufc/ml en:

- Agar sangre CO2
- Agar chocolate CO2
- MacConkey.

Si existe sospecha de hongos o Legionela: Centrifugar la muestra 15 min a 3.000 rpm y sembrar el sedimento en los medios adecuados.

8. Examen de los cultivos:

Examinar las placas incubadas en aerobiosis y CO₂ a las 18-24 horas. Si son negativas reincubar hasta 72 horas, excepto el MacConkey que se descartará si resulta negativo a las 18 horas. Las placas de hongos se reincuban hasta 21 días y si hay sospecha de algún patógeno exigente incubar el tiempo necesario.

9. Informes:

- Informar siempre del examen microscópico directo de la muestra.
- Si se aísla algún patógeno en recuento significativo: “Número UFC/ml de....”.
- Si se aísla algún patógeno en recuento inferior al significativo: “< de número de UFC/ml de.....”.
- Si no se aísla ningún patógeno y sí flora orofaríngea: “Desarrollo de flora orofaríngea”.
- Si el cultivo es negativo: “Cultivo negativo endías”.
- Se informará siempre la presencia de hongos, *Nocardia*, *Legionella* en cualquier cantidad.

b. Cepillado bronquial por cateter telescopado

1. Procedimiento:

Cultivo cuantitativo de bacterias aerobias y anaerobias productoras de infecciones de tracto respiratorio inferior. Recuentos significativos igual o mayor de 10³ UFC/ml.

2. Toma de la muestra:

Cepillar la mucosa bronquial del lóbulo afectado a través de un fibrobroncoscopio, mediante un cepillo telescopado protegido por un doble catéter ocluido distalmente para evitar la contaminación por flora de las vías altas.

3. Transporte y conservación:

Depositar el cepillo sin vaina en 1 ml de solución salina estéril o de lactato de Ringer. Enviar rápidamente al laboratorio. Si se retrasa el envío conservar a temperatura ambiente.

4. Procesamiento:

Homogeneizar la muestra en un agitador:

- Examen directo: con tinción de Gram para evaluar leucocitos, células epiteliales y morfotipos bacterianos.

5. Cultivo:

Sembrar cuantitativamente para permitir como mínimo un recuento de 10^3 UFC/ml

- Agar sangre CO₂.
- Agar chocolate CO₂.
- Agar MacConkey.
- Agar sangre en anaerobiosis.
- Otro medio selectivo para Anaerobios.

Si sospecha de hongos o *Legionella*: Centrifugar la muestra 15 minutos a 3000 rpm y del sedimento sembrar en medios adecuados.

6. Examen de los cultivos:

Examinar las placas incubadas de aerobiosis y CO₂ a las 18-24 horas. Examinar las placas de anaerobiosis a las 48 horas. Si son negativas reincubar hasta 72 horas, excepto el MacConkey que se descartará si resulta negativo a las 18 horas. Las placas de hongos se reincuban hasta 21 días y si hay sospecha de algún patógeno exigente incubar el tiempo necesario.

7. Informes:

- Informar siempre del examen microscópico directo.
- Si se aísla algún patógeno en recuento significativo: "Número de UFC/ml de.....".
- Si se aísla algún patógeno en recuento inferior al significativo: "< de Número de UFC/ml de....".
- Si no se aísla ningún patógeno y sí flora orofaríngea: "Desarrollo de flora orofaríngea".
- Si el cultivo es negativo: "Cultivo negativo en días".
- Se informará siempre la presencia de hongos, *Nocardia*, *Legionella* en cualquier cantidad.

c. Punción transtraqueal, punción transtorácica y biopsias respiratorias

1. Procedimiento:

- Cultivo de bacterias aerobias y anaerobias causantes de infección de tracto respiratorio inferior.
- Cultivo de levaduras y hongos filamentosos. Tinciones para *Pneumocystis* (por petición o sospecha en pacientes inmunodeprimidos).
- Cultivo de Micobacterias (por las características de las técnicas no se recogen en este protocolo).
- Cultivo de virus (por las características de las técnicas no se recogen en este protocolo).

2. Transporte y conservación:

Son muestras tomadas con técnicas muy invasivas por lo cual han de ser enviadas en contenedores estériles rápidamente al laboratorio. Las biopsias deben enviarse en 1 ml. de solución salina estéril para evitar su desecación. La política del laboratorio puede ser que el clínico contacte con el laboratorio de microbiología antes de enviar este tipo de muestra para que el laboratorio esté alerta.

3. Procesamiento:

Las biopsias serán homogeneizadas, por machacado en mortero estéril o con bisturí estéril (técnica más apropiada para cultivo de hongos)

4. Examen directo:

- Tinción de Gram: para evaluar leucocitos, células epiteliales y morfotipos bacterianos.
- Tinción de ácido- alcohol resistente.
- Tinción de hongos: (Blanco de calcoflúor, KOH, u otras).
- Inmunofluorescencia directa *Pneumocystis*.
- Inmunoflorescencia directa *Legionella*.

5. Cultivo:

- Agar Sangre CO2.
- Agar Chocolate CO2.
- Agar MacConkey.
- Agar Sangre Anaerobiosis.
- Otro medio selectivo anaerobios.
- Thioglicolato u otro caldo similar.
- Medios para hongos.
- Medio selectivo *Legionella* CO2.

6. Examen de los cultivos:

Examinar las placas incubadas de aerobiosis y CO₂ a las 18-24 horas. Examinar las placas de anaerobiosis a las 48 horas. Si son negativas reincubar hasta 72 horas, excepto el MacConkey que se descartará si resulta negativo a las 18 horas. Las placas de hongos se reincuban hasta 21 días y si hay sospecha de algún patógeno exigente incubar el tiempo necesario.

7. Informes:

Cualquier hallazgo significativo, se informará telefónicamente y por escrito tanto de los exámenes directos como de los cultivos.

Si hay crecimiento de microorganismos: informar con su identificación y antibiograma: "Desarrollo de...".

Si no hay crecimiento de microorganismos: "Cultivo negativo en días".

CRITERIOS FUNDAMENTALES DE IDENTIFICACIÓN DE LOS PATÓGENOS MÁS FRECUENTES

1. *S. pneumoniae*: Colonias α -hemolíticas en agar sangre, umbilicadas. Identificar con pruebas establecidas como solubilidad en bilis, sensibilidad a la optoquina.

2. *H.influenzae*: Colonias grisáceas en agar chocolate, que no crecen o lo hacen puntiformes o con satelitismo en agar sangre. Identificar con requerimiento de factores X, V, XV ú otras pruebas establecidas.

3. Enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores: Examinar en MacConkey si son fermentadores o no de la lactosa, oxidasa e identificación con las pruebas establecidas.

4. *S.aureus*: Colonias fermentadoras en agar manitol. Identificar con pruebas establecidas (coagulasa, DNasa, galerías..).

5. *M. catarrhalis*: Colonias blancas en agar sangre y agar chocolate, oxidasa positiva, DCGN. Identificar con pruebas establecidas: tributirina, fermentación de azúcares.

6. Levaduras: Colonias blancas con las típicas prolongaciones en agar sangre en aerobiosis se identifican como *C.albicans*. Si no presenta esta colonia característica identificar a nivel de especie por pruebas establecidas.

7. *Legionella*: Identificar con las pruebas establecidas, las colonias oxidasa positivas lenta, que se desarrollen en cualquier cantidad en el medio selectivo y no en medios comunes.

8. Nocardia: Bacilos Gram positivos ramificados y filamentosos. Tinción de Ziehl ó Kynoun: bacilos débilmente ácido- alcohol resistentes. Incubar las placas una semana 35°C/CO2: microcolonias (24-48 horas) filamentosas en forma de araña en BHI agar y macrocolonias (3-7 días) en forma de muela o con micelio aéreo o pigmentadas.

9. Hongos filamentosos: Identificar por características morfológicas en examen microscópico directo, laminocultivo, etc.

10. Anaerobios: crecimiento en medios en anaerobiosis y no crecimiento en medios en aerobiosis. Identificar por características coloniales, características microscópicas y pruebas adecuadas. Puede ser necesario estudio de sensibilidad.

A todos los microorganismos con significación clínica se realizarán pruebas de sensibilidad de acuerdo con el organismo aislado.